

文章编号: 1000—0615(2000)03—0285—04

·综述·

鱼类芳香化酶活性研究的进展

Advances on aromatase activity in fish

洪万树¹, 方永强²

(1. 厦门大学海洋学系, 福建 厦门 361005; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

HONG Wan-shu¹, FANG Yong-qiang²

(1. Oceanography Department, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

关键词: 鱼类; 芳香化酶

Key words: fish; aromatase

中图分类号: S91; Q55

文献标识码: A

鱼类的生殖活动受外部环境因素和神经内分泌的双重调节。下丘脑、脑垂体和性腺通过相互调节,促进和制约着鱼类生殖细胞的发生、性别分化和性腺发育成熟及其繁殖活动。如下丘脑产生促性腺激素释放激素(GnRH)可刺激脑垂体分泌促性腺激素(GtH)作用于性腺,促使性腺组织产生类固醇激素直接作用于生殖细胞,引起生殖细胞发育成熟和排卵。同时,类固醇激素也会反馈抑制 GnRH 和 GtH 的分泌。在类固醇激素的代谢过程中,需要多种酶参与催化,其中一种酶称为芳香化酶(aromatase),在其中起着关键的作用。许多研究表明,芳香化酶能够催化某些雄激素(如睾酮和雄烯二酮)转化为雌激素。这一转化过程对鱼类、鸟类、爬行类和两栖类等脊椎动物的性分化和性腺发育是必不可少的^[1~3]。本文就80年代初发现鱼类脑垂体有芳香化酶活性^[9]以来的十几年,国外对鱼类产生芳香化酶的组织、芳香化酶活性与鱼类性腺发育关系的研究成果作一综述,为鱼类生殖内分泌调控和鱼类人工繁殖的技术路线提供理论依据。

1 研究方法和原理

鱼类芳香化酶活性的研究方法有体内埋植、胚胎或幼体浸泡以及离体组织培养等几种。其原理是根据某些芳香化酶抑制剂能抑制或降低芳香化酶的活性,妨碍类固醇激素的正常代谢途径,使类固醇激素的生成量发生变化,从而影响了鱼类正常的性分化和性细胞发育。现就各种方法作一简要介绍:(1)体内埋植法是将抑制剂做成硅胶药丸埋植入鱼体内,让药物逐渐释放到血液中,进入组织内发生作用,然后测定血液中类固醇激素(如1 β -雌二醇)的生成量,观察性腺细胞发育进程,间接了解芳香化酶活性在鱼类性腺细胞发育中的作用;(2)浸泡方法是将抑制剂溶解于培养液中浸泡胚胎或幼体,抑制剂经皮肤和鳃组织进入体内发挥作用,持续处理一段时间后,检查实验动物的性别分化和性腺发育情况,此种方法主要用于研究类固醇激素对鱼类性分化的影响;(3)离体组织研究方法是将鱼体内主要产生芳香化酶组织(如脑和脑垂体)移到体外进行组织培养,通过测定代谢产物的含量来确定芳香化酶活性的高低。具体做法是将被测组织捣碎做成匀浆,加入氚标记的雄激素(如雄烯二酮和睾酮),在一定的环境条件下,经过一段时间的孵育后,以放射免疫测定法(RIA)及其他方法测定样品中雌激素(如雌酮和雌二醇)的含量,从中得出芳香化酶催化雄激素转化为雌激素的能力^[10, 11]。此种方法主要用于测定不同组织间芳香化酶的活性。

常采用的芳香化酶抑制剂有类固醇型的抑制剂,如ATD(androsteronedione 雄烷二酮)和4OH(4-hydroxyandrostenedione, 4-羟雄烯二酮)以及非类固醇型的抑制剂(如Fadrozole—CGS16949和Letrozole—CGS20267)。

收稿日期: 1998—12—22

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C96008)

作者简介: 洪万树(1955—), 男, 厦门大学副研究员。Tel: 0592—2186609, E-mail: wshong@jingxian.xmu.edu.cn

2 芳香化酶在鱼类体内的分布

许多研究者已证实,芳香化酶广泛存在于大多数脊椎动物(从鱼类到鸟类)的脑和垂体中,但在鱼类(金鱼和蟾科鱼类)脑和垂体中的水平比其他脊椎动物高出 100 倍^[12]。进一步研究发现,芳香化酶还存在于鱼类的性腺中^[12~14]。鱼类体内雌激素的生成量与芳香化酶的活性有关,成熟金鱼(*Carassius auratus*)和琵琶鱼(*Opsanus tau*)芳香化酶主要集中在脑垂体和前脑,它们中的神经内分泌组织能够产生大量的雌激素。琵琶鱼延脑和脊髓前部产生雌激素的量高于中脑和后脑以及脊髓的其它部分^[15]。产生芳香化酶有特定的区域和特殊的分泌细胞类群,莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)脑垂体中产生芳香化酶的主要部位是在 PPD(proximal pars distalis, 间叶)区,它产生芳香化酶的量比 NIL(neurointermediate lobe 过渡叶)区高出 2~5 倍^[16]。大杜父鱼(*Myoxocephalus octodecimspinosus*)^[12]、虹鳟(*Salmo gairdneri*)^[17]、金鱼和琵琶鱼^[13]、非洲鲶鱼(*Clarias fariqupinus*)^[18]和三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*)^[19]等间脑中芳香化酶的活性都很高。

鱼类脑垂体中芳香化酶催化雄激素转化为雌激素的速率在不同种类之间也有差异。金鱼的转化速率最高^[13],为 $3.6 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;琵琶鱼次之^[15],为 $1.6 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;其他种类如大西洋鲑鱼(*Salmo salar*)^[20], $0.6 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;三刺鱼^[19], $0.1 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$;大杜父鱼^[14], $0.1 \text{ pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。这种差异的原因目前尚不清楚,仍有待进一步探讨。

3 芳香化酶活性与个体发育和性别的关系

鱼类雌雄个体间以及成熟个体与未成熟个体间芳香化酶的活性存在着一定的差异。曾有研究表明,雌大杜父鱼脑垂体中芳香化酶的活性比雄大杜父鱼高得多,合成雌激素的量显著多于雄鱼^[21]。成熟的和未成熟的雄性大西洋鲑鱼脑部和脑垂体组织能将雄烯二酮转化为雌酮和 1β -雌二醇,由于成熟的雄性大西洋鲑鱼脑部芳香化酶活性比未成熟的个体高,因此合成雌激素的能力比未成熟的个体强,尤其是端脑和间脑两部分^[20]。脑垂体合成雌激素的能力在未成熟雌鱼和未成熟雄鱼之间没有区别^[20]。莫桑比克罗非鱼脑垂体中 RPD(rostral pars distalis, 前叶)和 PPD 两区域芳香化酶活性的差别雌雄之间不明显,但小脑中雌鱼的含量高于雄鱼,而神经垂体中叶则雄鱼高于雌鱼^[16]。金鱼生殖季节期间脑部芳香化酶的活性雌鱼高于雄鱼,而脑垂体中这种现象不明显^[22]。性未分化或刚分化的虹鳟鱼苗中没有出现芳香化酶活性^[23]。

4 芳香化酶活性对卵子发育和性别分化的影响

硬骨鱼类脑中芳香化酶活性会随季节变化而波动。生殖季节过后的大西洋鲑鱼,端脑和间脑中芳香化酶的活性降低^[24]。金鱼和三刺鱼脑中芳香化酶的活性生殖季节高于非生殖季节^[19, 22]。日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)血液中 1β -雌二醇的含量与芳香化酶的活性有关,滤泡细胞层分泌 1β -雌二醇的量取决于芳香化酶活性的高低^[25]。芳香化酶通过催化雄激素转化为雌激素的过程来加速卵子发育早中期物质能量的积累,但过高的活性对卵子发育后期则有抑制作用。在卵母细胞胚泡迁移阶段,过高的芳香化酶活性会抑制日本鳗鲡 17α , 20β 双羟孕酮的形成,并妨碍卵母细胞的成熟和排卵^[25]。大眼鲱鲈(*Stizostedion vitreum*)和金鱼在产卵之前体内芳香化酶的活性受到调节而降低^[22, 26]。Young 等^[27]以马苏大麻哈鱼(*Oncorhynchus rhodurus*)滤泡膜颗粒细胞层分泌 1β -雌二醇的水平来研究芳香化酶活性随性细胞发育过程的变化。结果表明,颗粒细胞层 1β -雌二醇在卵黄形成期呈上升趋势,到卵黄形成末期达到最高峰,之后迅速下降,卵子成熟时达到最低点。综合以上的研究结果可以认为,芳香化酶通过催化雄激素转化为雌激素,促使肝脏合成卵黄蛋白原,保证了卵母细胞的卵黄生成和积累,使得卵子的发育能够正常地进行。因此,可以认为芳香化酶的活性对鱼类卵母细胞的发育有重要作用。一种胎生虹鳟(*Poecilia reticulata*)怀孕期的长短与芳香化酶的活性高低有关,当芳香化酶的活性较高时,怀孕期缩短^[28]。一般情况下,大西洋鲑鱼要在海里生活一段时间再洄游到淡水中进行产卵繁殖,但有些雄性的大西洋鲑鱼在入海之前性腺就已成熟。这种早熟现象,Rowe 等^[29]认为与芳香化酶的活性有关。

利用芳香化酶抑制剂来研究性类固醇的芳构化过程在鱼类性别分化过程的作用已有报道。Pfeffer 等^[6, 30]以浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的非类固醇型芳香化酶抑制剂 Fadrozole 浸泡性未分化的大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*) 2 h,使原来具有雌性遗传基因的个体发育成表现型的雄鱼,其精巢大小和组织结构与正常雄鱼精巢无差异,并能完成整个精子形成过程。两年后,用它们产生的精子与正常雌鱼的成熟卵受精,胚胎发育正常,子代全为雌性。这种方法可为定向培育雌鱼提供一条新途径。

5 芳香化酶活性的调节

有关芳香化酶活性调节机理目前了解甚少。已有的研究结果认为,鱼类和其他脊椎动物脑中芳香化酶活性受性腺或血液中性激素的调节。切除性腺的雄性大西洋鲑鱼,其脑中芳香化酶活性降低,如果再给以埋植睾酮或 11β -酮基雄烯二酮,脑中芳香化酶活性就会提高^[24]。其他的研究也表明,睾酮对脑中性类固醇激素的芳构化作用有正面的影响,它能促进金鱼^[22]和美洲鳗鲡^[31]脑中性类固醇激素芳构化过程的进行。以睾酮处理的虹鳟,其脑垂体中芳香化酶活性提

高^[32]。17β-雌二醇也会提高金鱼脑中芳香化酶的活性, 而5α-双羟睾酮则不会影响其活性^[22]。Manning和Kime^[33]认为, 卵黄形成期芳香化酶的活性高, 卵黄形成末期芳香化酶活性降低, 调节这一变化过程是卵巢本身而非脑垂体。在神经组织或腺体组织中芳香化酶活性分别有不同的调节机制。例如以雌激素或可被芳构化的雄激素处理金鱼, 结果使金鱼脑中芳香化酶的活性提高, 但脑垂体中芳香化酶活性不受影响^[14]。芳香化酶的活性也会影响促性腺激素的分泌, Crime等^[34]发现, 虹鲟体内促性腺激素的含量随芳香化酶活性的提高而增加。类固醇型芳香化酶抑制剂ATD会抑制睾酮刺激脑垂体分泌促性腺激素^[34]。给大西洋鲑鱼埋植含有不同芳香化酶抑制剂(ATD、4OH和Fadrozole)硅胶药丸, 结果埋植ATD和Fadrozole的个体, 其脑中芳香化酶的活性低于对照组; 而埋植4OH的个体与对照组无差异。通过测定血液中雄激素11-酮睾酮和孕激素17α, 20β双羟孕酮的含量, 发现ATD和Fadrozole明显降低17α, 20β双羟孕酮的水平, 但不影响11-酮睾酮的含量; 而4OH会降低11-酮睾酮的含量。ATD和4OH两者均会提高成熟雄鱼的比例^[35]。

6 结论与展望

对鱼类芳香化酶活性的研究是鱼类生殖内分泌学和生殖生理学研究的前沿领域之一, 经十几年的研究, 在某些方面已取得进展。如已有的研究初步表明, 芳香化酶在鱼类性分化过程中具有重要作用, 鱼类卵母细胞中卵黄的形成也需要性类固醇的芳构化过程。对鱼类芳香化酶活性的研究, 目前仅限于少数硬骨鱼类, 其他多数硬骨鱼类或软骨鱼类是否存在类似的情况, 有待今后进一步研究。对鱼体内芳香化酶活性的研究主要集中在脑部、脑垂体和脊髓, 性腺和其他组织芳香化酶活性的研究报道甚少。

从现有的研究资料看, 芳香化酶在脊椎动物雄性个体生殖中的作用还不十分清楚, 例如不同的芳香化酶抑制剂对雄性大西洋鲑性腺的发育有不同程度的影响^[35], 4OH对鳄鱼胚胎精巢的发育没有明显的作用, 但对其他脊椎动物性分化和胚胎精巢的发育有着重要的影响。在脊椎动物雄性精子发生和形成以及精巢发育过程中芳香化酶起什么作用? 脊椎动物不同类群之间, 甚至不同种类之间, 是否存在不同的芳香化酶活性调节机理? 这些都是今后要探讨的课题。关于芳香化酶的调节机理较为复杂, 有些研究结果不尽一致, 还没有形成统一的看法。目前只知道与性激素含量的变化有关, 与其他因素的关系如何, 也还需要进一步的探讨。

参考文献:

[1] Elbrecht A, Smith R G. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens[J] . Science, 1992, 1255: 467 ~ 470.

[2] Desvages G M, Girondot M, Pieau C. Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle, *Dermochelys coriacea*[J] . Gen Comp Endocrinol, 1993, 92: 54 ~ 61.

[3] Lance A V, Bogart M H. Distribution of ovarian development in alligator embryos treated with an aromatase inhibitor[J] . Gen Comp Endocrinol, 1992, 86: 59 ~ 71.

[4] Raeside J I, Wilkinson C R. Ontogenesis of estrogen secretion by porcine fetal testis[J] . Acta Endocrinol, 1993, 128: 549 ~ 554.

[5] Yu N W, Hsu C Y, Ku H H, et al. Gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of varies of *Rana catesbiana* tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione[J] . J Exp Zool, 1993 265: 252 ~ 257.

[6] Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, et al. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation cause chromosomally female salmon to develop as normal, functional males[J] . J Exp Zool, 1994 270: 255 ~ 262.

[7] Richard-Mercier N, Dorizzi M, Desvages G, et al. Endocrine sex reversal of gonads by the aromatase inhibitor letrozole (CGS20267) in *Emys orbicularis*, a turtle with temperature-dependent sex determination[J] . Gen Comp Endocrinol, 1995 100: 314 ~ 326.

[8] Wennstrom K L, Crews D. Making males from females: The effects of aromatase inhibitors on a parthenogenetic species of whiptail lizard[J] . Gen Comp Endocrinol, 1995, 99: 316 ~ 322.

[9] Callard G V, Peter Z, Ryan K J. Biochemical evidence for aromatization of androgen to estrogen in the pituitary[J] . Gen Comp Endocrinol, 1981, 44: 359 ~ 364

[10] Afonso L O B, Campbell P M, Iwama G K, et al. The effects of the aromatase inhibitor fadrozole and two polynuclear aromatic hydrocarbons on sex steroid secretion by ovarian follicles of coho salmon[J] . Gen Comp Endocrinol, 1997, 106: 169 ~ 174.

[11] Bilin'ska B, Les'niak M, Schmalz B. Are ovine leydig cells able to aromatize androgens[J] . Reprod Fertil Dev, 1997, 9: 193 ~ 199.

[12] Callard G V, Peter Z, Ryan K J. Estrogen synthesis in vitro and in vivo in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*)[J] . Gen Comp Endocrinol, 1981, 29: 14 ~ 20.

[13] Callard G V, Peter Z. Brain estrogen biosynthesis and estrogen conjugating system in the sculpin (*Myoxocephalus*)[J] . Bull Mt Desert Isl Biol Lab Rep, 1982 22: 41 ~ 43.

[14] Monod G A, Mones D, Foster A. Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular estradiol secretion by imidazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Int Sym on responses of marine organisms to pollutants[J] . Woods Hole MA USA, 1992, 35(1 ~ 2): 153 ~ 167.

[15] Pasmanik M, Callard D V. Aromatase and 5α-reductase in the teleost brain, spinal cord and pituitary gland[J] . Gen Comp Endocrinol, 1985, 60: 244 ~ 251.

- [16] Callard G V, Specker J L, Knapp J, et al. Aromatase is concentrated in the proximal pars distalis of tilapia pituitary[J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 71: 70~79.
- [17] Lambert J G D, Van Den Hurk R. Localization of aromatase activity in the brain of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [A]. In: Ridher C J J, Goos H J T, eds. Reproductive physiology of fish [C]. Pudoc Wageningen, 1982, 57.
- [18] Timmers R J M. Location of aromatase in the brain of the male African catfish, *Clarias garipinus*, by microdissection and biochemical identification[J]. J Comp Neurol, 1987, 258: 368~377.
- [19] Borg B, Timmers R J M, Lambert J G D. Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*; 1. Distribution and effects of season and photoperiod[J]. Exp Biol, 1987, 47: 63~68.
- [20] Anderson E, Borg B, Lambert J G D. Aromatase activity in brain and pituitary of immature and mature Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr [J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 72: 364~401.
- [21] Olivereal M, Callard G. Distribution of cell types and aromatase activity in the sculpin (*Myoxocephalus*) pituitary[J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 53: 230~290.
- [22] Pasmanik M, Schlinger B A, Callard G V. In vivo steroid regulation of aromatase and 5 α -reductase in goldfish brain and pituitary[J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 71: 175~182.
- [23] Van Den Hurk R, Lambert J G D, Peute J. 1982. Steroidogenesis in the gonads of rainbow trout fry *Salmo gairdneri* before and after the onset of gonadal sex differentiation[J]. Reprod Nutr Develop, 1982, 22: 413~426.
- [24] Mayer G A, Borg B, Berglund I, et al. Effects of castration and androgen treatment on aromatase activity in the brain of mature Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) parr [J]. Gen Comp Endocrinol, 1991, 82: 86~92.
- [25] Ijiri S, Kazeto Y, Takeda N, et al. Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica* [J]. Aquac, 1995, 135 (1~3): 3~16.
- [26] Barry T P. Induced final oocyte maturation and spawning in walleye (*Stizostedion vitreum*) [J]. USA World Aquac Soc, 1992, 35.
- [27] Yong G, Kagawa H, Nagahama Y. Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cell of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation[J]. Biol Reprod, 1983, 29(2): 310~315.
- [28] Venkatesh B, Tan C H, Lam T J. Progestins and cortisol delay while estradiol-17 β induces early parturition in the guppy, *Poecilia reticulata* [J]. Gen Comp Endocrinol, 1991, 83: 297~305.
- [29] Rowe D K, Thorpe J E, Shanks A M. Role of fat stores in the maturation of male Atlantic salmon (*Salmon salar*) parr [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48: 405~413.
- [30] Piferrer F, Baker I J, Donaldson E M. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1993, 91: 59~65.
- [31] Callard G V, Olivereal M, Craig D J. Identification and intracellular distribution of aromatase in the eel (*Anguilla rostrata*) pituitary [J]. M Desert Isl Biol Lab Rep, 1985, 25: 6~7.
- [32] Crim L M, Evans D E. Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Gen Comp Endocrinol, 1979, 37: 192~196.
- [33] Manning N J, Kime D E. Temperature regulation of ovarian steroid production in the common carp, *Cyprinus carpio* L., in vivo and vitro [J]. Gen Comp Endocrinol, 1984, 56: 376~388.
- [34] Crim L M, Peter R E, Billard R. Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormone [J]. Gen Comp Endocrinol, 1981, 44: 374~381.
- [35] Anotonopolou E, Mayer I, Berglund I, et al. Effects of aromatase inhibitors on sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr [J]. Fish Physiol Biochem, 1995, 14(1): 15~24.